



**Universidad
Zaragoza**

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

FACULTAD DE CIENCIAS



Máster en Química Industrial. Curso 2020/2021

Aptitud sanitaria de materiales reciclados para contacto alimentario

TRABAJO FIN DE MÁSTER

*Departamento Química Analítica, grupo GUIA
Instituto de Investigación en Ingeniería de Aragón (I3A)
Escuela de Ingeniería y Arquitectura (EINA)*

AUTOR: DIEGO FERNÁNDEZ PARDO

TUTORES: M. CRISTINA NERÍN DE LA PUERTA, ELENA CANELLAS AGUARELES.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1. Antecedentes: Migración y NIAS.....	2
1.2. Objetivos.....	5
1.3. Legislación.....	5
1.3.1. Reglamento (CE) n° 1935/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 27 de octubre de 2004, sobre los materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos y por el que se derogan las Directivas 80/590/CEE y 89/109/CEE ⁷	6
1.3.2. Reglamento (UE) N° 10/2011 de la Comisión de 14 de enero de 2011 sobre materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos ⁸	6
2. MÉTODOS EXPERIMENTALES.....	7
2.1. Muestras analizadas.....	7
2.2. Reactivos.....	7
2.3. Simulantes.....	8
2.4. Ensayos de migración.....	8
2.5. Condiciones.....	8
3. TÉCNICAS DE ANÁLISIS.....	9
3.1. Cromatografía de ultra-alta presión acoplada a un espectrómetro de masas de triple cuádrupolo (UPLC-MS-TQ).....	9
4. DATOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	10
4.1. Optimización de las condiciones.....	10
4.1.1. Optimización del voltaje.....	10
4.1.2. Optimización de la técnica de detección.....	10
4.2. Recta de calibrado.....	12
4.2.1. Cálculo de migraciones en simulantes a partir de la recta de calibrado.....	16
4.3. Preparación disoluciones de adición estándar para el análisis de las migraciones a cava.....	18
4.3.1. Cálculo de migraciones a partir de la recta de adición estándar en cava.....	19
5. CONCLUSIONES.....	24
6. BIBLIOGRAFÍA.....	25
7. ANEXOS.....	26

RESUMEN

Los materiales para contacto alimentario contienen múltiples aditivos en su composición. Ciertas sustancias que los componen pueden acabar formando parte del alimento o generando otras sustancias no intencionadamente añadidas que cambien las propiedades del envase o del alimento debido a su migración al mismo, por ello es de vital importancia poder analizar los migrantes y ver que los niveles de sustancias que podrían ser tóxicas, no superan los límites establecidos por la legislación vigente.

En este trabajo se optimiza un método analítico para poder cuantificar dos tipos de aminas generadas a partir de la reacción de los diisocianatos provenientes de un adhesivo utilizado en corchos con el agua contenida en bebidas alcohólicas. El objetivo es crear un método analítico con una alta selectividad debido a que se va a trabajar con matrices complejas (alimento). El método deberá tener además alta sensibilidad para poder detectar trazas de los migrantes. La técnica empleada es la cromatografía líquida de ultra-alta resolución (UPLC) acoplada a un espectrómetro de masas tipo triple cuadrupolo.

ABSTRACT

Materials used in food containers have numerous additives in its composition. Certain substances present in these materials could be transferred into the food and perhaps generate other substances in a non-intentionally way, that could change the properties of the container or the food. That's why it is crucial to analyze the migration to see if toxic substances migrate, and that they don't exceed the limits established by the legislation.

In this project an analytical method is optimized, which quantifies two types of amines generated from the diisocyanates reaction coming from the adhesive used in alcoholic drinks corks. The aim is to create an analytical method able to apply to a complex matrix (food) and with high sensitivity, in order to detect the migrants at trace level. The technique used in this case is ultra-high performance liquid chromatography coupled with a mass spectrometer.

1. INTRODUCCIÓN

Los envases alimentarios tienen la función de almacenar alimentos sin perjudicar su calidad. Los envases alimentarios, entre los que se encuentran botellas, cajas, latas, envases plásticos, etc... pueden contener sustancias químicas que podrían migrar y acabar contaminando el alimento.

En este trabajo se ha llevado a cabo un estudio de migración de sustancias al alimento, como son los corchos utilizados en botellas de bebidas alcohólicas.

1.1. Antecedentes: Migración y NIAS

La migración se define como la transferencia de una sustancia presente en un material al alimento. Depende de diversos factores como las propiedades físicas y químicas del compuesto y del alimento; de la naturaleza del material usado para la fabricación del material; del tiempo de contacto entre ambos; de la temperatura; del estado en el que se encuentra el alimento...¹

Este fenómeno acarrea unas consecuencias tanto en el alimento, alterando su composición, como en el envase afectando sus características. La incorporación de nuevas sustancias al alimento puede convertirse en un grave problema, debido tanto a la migración de sustancias intencionadamente añadidas al envase como por la posibilidad de formación compuestos no intencionadamente añadidos (NIAS), que podrían ser especies tóxicas. Es por eso que hay una legislación en la que se establece una lista positiva de sustancias que se pueden emplear en la fabricación de materiales para contacto alimentario y unos límites de migración de las mismas a alimentos.

Se puede distinguir entre migración global y específica. La migración global es la cantidad total de sustancias que migran del material de envase al alimento, sean conocidas o no, en las condiciones de almacenamiento y contacto establecidas en el Reglamento 10/2011/CE. La migración específica se refiere a la cantidad de una sustancia específica que ha migrado al alimento.¹

Los envases y los materiales para contacto con alimentos difieren en su composición, por eso la migración se va a producir de diferentes formas. Los materiales los podemos clasificar en materiales metálicos, vidrio y materiales cerámicos y materiales poliméricos.

- ❖ En materiales metálicos la migración se va a producir por la corrosión de éste, e irá incorporando iones metálicos al alimento.
- ❖ En materiales cerámicos y vidrio la interacción se produce por disolución del material o lixiviación.
- ❖ En materiales poliméricos la transferencia de masa desde la matriz polimérica hasta el alimento, provoca la migración de sustancias.

En este último caso, para que suceda la migración, la sustancia tiene que difundir desde la matriz polimérica hasta su superficie para incorporarse al alimento. Por lo que las constantes que van a determinar este proceso serán la constante de difusión y la constante de reparto.¹

- La constante de difusión puede definirse como la evolución de la concentración de una sustancia en función del tiempo. Se ve afectada por la estructura del polímero, ya que una molécula irá desplazándose aleatoriamente por la matriz polimérica, y de su estado. Respecto a la especie migrante, influirán su tamaño y su masa molecular, que cuanto menor sean mayor movimiento habrá.¹
- La constante de reparto en términos de migración se refiere al cociente entre la concentración del migrante en el alimento entre la concentración del migrante en el polímero, en el equilibrio. Cuanto mayor sea, mayor será la cantidad de sustancias que migren al alimento. Los factores que influyen en la constante de reparto son varios como el pH, la polaridad de las moléculas, la temperatura... pero el más destacable es la solubilidad entre el polímero y el migrante.¹

Podremos distinguir entre migrantes intencionadamente añadidos al envase y no intencionadamente añadidos (NIAS: non intentionally added substances). Estas sustancias pueden aparecer como impurezas, productos de reacción, productos de degradación... Estos productos secundarios normalmente se forman durante la producción de las sustancias de partida, aunque también pueden generarse en las etapas posteriores.²

El estudio de los NIAS es difícil, ya que no están bien caracterizados ni e conocen, ni tampoco su procedencia, además de estar en concentraciones muy bajas. Es por ello que se requieren técnicas avanzadas con alta sensibilidad y resolución para poder realizar satisfactoriamente su identificación.³

En las bebidas alcohólicas, como el vino o el champagne, en la mayoría de los casos se almacenan en botellas de vidrio cerradas con un tapón de corcho. Este tipo de material adquiere cierta importancia debido a sus propiedades, ya que preserva las propiedades del vino y el champagne con el paso del tiempo y garantiza que evolucione correctamente en la botella, evitando que entre una gran cantidad de oxígeno que dañaría la bebida y a la vez es una barrera para bacterias y hongos.⁴

Normalmente, para abaratar los costes en la producción, el tapón de corcho que cierra la botella está compuesto por una serie de discos de corcho natural, procedente del alcornoque, unida a otra parte que es un conglomerado, mediante un adhesivo, como se muestra en la figura 1.

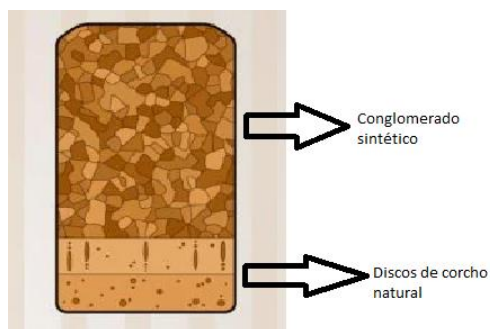


Figura 1. Estructura de un tapón de corcho para champagne.

El adhesivo que une ambas partes va a cobrar relevancia, ya que de él van a surgir la mayoría de los NIAS que puedan migrar al alimento. Para poder identificar los compuestos es necesario conocer su procedencia, en estos casos es fundamental conocer las etapas de fabricación para conseguir predecir cómo y qué compuestos se han podido formar. Además de las etapas de fabricación, también es necesario conocer las condiciones de uso, en las cuales también pueden producirse migraciones. El adhesivo más comúnmente utilizado es el poliuretano (Figura 2), por su estabilidad con la temperatura, flexibilidad, durabilidad y resistencia al impacto.³

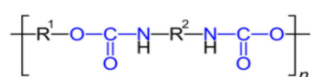


Figura 2. Polímero poliuretano

Los poliuretanos usados para los tapones de corcho bajo estudio están basados en isoforondiisocianato (IPDI) (Figura 3) y hexametilendiisocianato (HDI) (Figura 4). La principal ventaja de estos diisocianatos, desde el punto de vista de la seguridad alimentaria, es que son isocianatos alifáticos y generan aminas alifáticas, las cuales no son cancerígenas. Al contrario que los isocianatos aromáticos, que al reaccionar con agua producen aminas aromáticas y éstas sí que son cancerígenas.

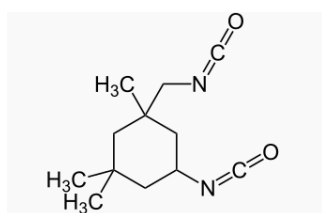


Figura 3. Isoforondiisocianato (IPDI).

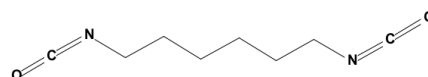
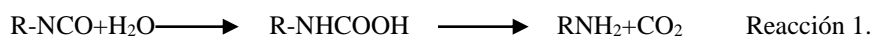


Figura 4. Hexametilendiisocianato (HDI).

Estos dos compuestos al entrar en contacto con agua producen la reacción 1, formando las correspondientes aminas.



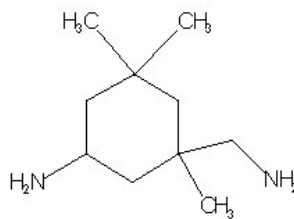


Figura 5. Isoforondiamina (IPDA).

La IPDA (Figura 5), según la ECHA (European Chemicals Agency) es una amina corrosiva y peligrosa para la salud. Es nociva si es ingerida y en contacto con la piel causando graves quemaduras, también provoca daños en los ojos. Es perjudicial para los organismos acuáticos con un efecto duradero.⁵

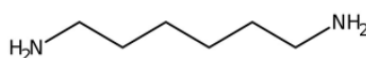


Figura 6. 1,6-hexanodiamina (HDA).

La HDA (Figura 6) de acuerdo con la ECHA también es una amina corrosiva y peligrosa para la salud. Causa graves quemaduras en contacto con la piel y daño en los ojos, además si es inhalada puede provocar irritación en el aparato respiratorio.⁶

1.2. Objetivos

El objetivo de este trabajo es cuantificar las aminas formadas por la reacción de los diisocianatos residuales que proceden del adhesivo del corcho hasta el alimento, que en este caso es la bebida alcohólica. Para ello, es necesario optimizar un método y de esta manera operar en las mejores condiciones posibles, obteniendo unos resultados con la calidad analítica necesaria. La optimización del método no es solamente acondicionar el equipo de medida, sino también todos los pasos que se incluyen desde la toma de muestras hasta la discusión de los resultados. Por lo que en este trabajo también se estudiará la repercusión de diferentes factores en los resultados como las distintas diluciones del analito o los diversos disolventes a utilizar. También es de vital importancia contar con la sensibilidad adecuada, ya que en este tipo de análisis las concentraciones son muy pequeñas.

1.3. Legislación

La legislación conforme a este tema debe ser segura y estar actualizada, ya que se van a ir incorporando nuevos materiales para estar en contacto con alimentos. Es por ello que tenemos las siguientes legislaciones.

1.3.1. Reglamento (CE) n° 1935/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 27 de octubre de 2004, sobre los materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos y por el que se derogan las Directivas 80/590/CEE y 89/109/CEE⁷

Este Reglamento expresa los requisitos que debe tener un material para estar en contacto con alimentos y para su fabricación entre otros. Los artículos más destacables son los siguientes:

- Artículo 1: nos habla sobre la finalidad y el objeto de este Reglamento, que es garantizar un elevado nivel de protección de la salud humana y de los intereses de los consumidores, en lo referente a los materiales que están en contacto con los alimentos, tanto directa como indirectamente. También existen algunas excepciones como son los materiales y objetos que son suministrados como antigüedades; los materiales de recubrimiento o revestimiento, como por ejemplo la corteza del queso; los equipos fijos, públicos o privados, de suministro de agua.
- Artículo 3: establece que los materiales deben de estar fabricados en conformidad con las buenas prácticas de fabricación (GMP), para que no transfieran sus compuestos a los alimentos, pudiendo representar un peligro para la salud humana, modificar la composición de los alimentos de forma inaceptable o provocar una alteración de sus propiedades organolépticas.
- Artículo 5: especifica tanto las medidas que se podrán tomar para grupos de materiales y objetos como además enumera en el Anexo I, el listado de sustancias para los que podrán establecerse medidas específicas. En el número dos de este listado aparece el material que nos concierne, los adhesivos.
- Artículo 7: dicta que las disposiciones que puedan afectar a la salud pública deben de ser consultadas a la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria, la cual definiremos en el siguiente apartado.
- Artículo 8 y 9: figuran los requisitos y el procedimiento para la autorización de nuevas sustancias para el contacto con alimentos. La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria será quien determine la autorización.
- Artículo 17: pone de manifiesto la importancia de la trazabilidad y por eso debe estar garantizada a lo largo de todas las etapas.

1.3.2. Reglamento (UE) N° 10/2011 de la Comisión de 14 de enero de 2011 sobre materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos⁸

En este Reglamento se especifican las medidas del artículo 5 del Reglamento citado en el apartado anterior. En el Anexo I, cuadro 1, aparece el listado de sustancias en las que se detallan a través de columnas ciertos usos y parámetros.

Las columnas que interesan para el desarrollo de este trabajo son:

- Columna 5: indica si la sustancia está autorizada para su uso como aditivo o como auxiliar para la producción de polímeros.
- Columna 6: muestra la autorización o no de la sustancia para ser usada como monómero, sustancia de partida o macromolécula obtenida por fermentación microbiana.
- Columna 7: detalla si los resultados de migración relativos a la sustancia pueden ser corregidos aplicando el coeficiente de reducción de grasas FRF (Fat Reduction Factor).
- Columna 8: especifica el límite de migración específica (LME) aplicable para la sustancia, se expresa en mg de sustancia por kg de alimento. Si aparece “ND” significa que la sustancia no debe migrar en cantidades detectables.

Tabla 1. Cuadro correspondiente a los datos del cuadro 1 del Anexo I del Reglamento (UE) N° 10/2011.

	Columna 5	Columna 6	Columna 7	Columna 8
HDA	No	Sí	No	2,4 mg/kg
IPDA	No	Sí	No	6 mg/kg

2. MÉTODOS EXPERIMENTALES

2.1. Muestras analizadas

Las muestras analizadas fueron de cava, y para la optimización del método se utilizaron los simulantes y las condiciones que se especifican en el Reglamento (UE) N° 10/2011.

2.2. Reactivos

- Etanol y metanol de calidad para cromatografía de líquidos de altas prestaciones y ácido acético glacial fueron suministrados por ScharlauChemie S.A. (Sentmenat, Spain).
- 1,6-hexadiamina e isoforondiamina fueron adquiridos de Sigma-Aldrich Química S.A. (Madrid, España)
- Agua ultra pura fue usada para la cromatografía.
- Cabré y Sabaté cavas españoles con un 11,5% vol en etanol se compraron en el supermercado.
- Adhesivo de poliuretano fue suministrado por una compañía bajo un acuerdo confidencial.
- Tapón de corcho donde la parte conglomerada (cuerpo) fue pegada a un disco de corcho con el adhesivo poliuretano suministrado por la misma compañía.

2.3. Simulantes

Según el Reglamento (UE) N° 10/2011 para simular la matriz del cava debemos utilizar la disolución que nos indica el cuadro 2 del Anexo III. El cava es una bebida alcohólica con una graduación de entre 10-12% volumen, por lo que está dentro de la categoría 01.01 en la cual se utiliza el simulante C, que es una disolución acuosa de etanol al 20% en volumen. También hay que considerar que el cava es una bebida con anhídrido carbónico por lo que tendrá cierta acidez, así que también se realizarán ensayos con la disolución C, ésta es una disolución acuosa compuesta por ácido acético al 3% en volumen.

2.4. Ensayos de migración

Además de las migraciones en los simulantes, también se realizaron migraciones y análisis en muestras de cava.

Para todos los ensayos, se prepararon disoluciones con unos volúmenes de 100 ml de cava y se sumergieron tapones de corcho pegados con el adhesivo de poliuretano descrito en el apartado 2.2. Estas disoluciones para simular las peores condiciones posibles, se dejaron 10 días en una estufa a 60°C.

Se unieron las dos partes del corcho del mismo modo que en la figura 1, con un adhesivo tipo poliuretanos. Se prepararon tres réplicas, los corchos se introdujeron en 100 mL de cava y se mantuvieron durante 10 días en una estufa a 60°C. Los pesos de adhesivos para pegar las partes de los corchos se recogen en la tabla 19. Además de estas 3 disoluciones se preparó una disolución de cava solamente, sin sumergirle corcho, y se mantuvo a las mismas condiciones como blanco.

Una vez pasado el período de tiempo estipulado en Reglamento (UE) N° 10/2011, se tomaron alícuotas de las disoluciones y se hizo una dilución 1:10 con agua para después extrapolar los resultados con las rectas de calibrado obtenidas a partir de las disoluciones en ácido acético al 3% y en etanol al 20%.

2.5. Condiciones

A la hora de realizar los ensayos de migración, las condiciones se estipulan en el Anexo V. Hay que tener en cuenta las peores condiciones de contacto y por tanto de almacenamiento, en este caso el cava puede estar almacenado por tiempos superiores a 6 meses a temperatura ambiente. Según el apartado 2.1.4. Condiciones específicas para tiempos de contacto superiores a 30 días a temperatura ambiente o inferior, el tiempo de contacto deberá ser de 10 días a 60 °C.

3. TÉCNICAS DE ANÁLISIS

Como ya se sabe que los adhesivos producen la migración de las aminas mencionadas en el apartado 1.1, 1,6-hexanodiamina e isofofondiamina, generadas por la reacción de los correspondientes diisocianatos con el agua, es necesario utilizar un equipo con una alta selectividad y una alta sensibilidad para poder cuantificar dichos compuestos como es la cromatografía de ultra alta presión acoplada a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo.

3.1. *Cromatografía de ultra-alta presión acoplada a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (UPLC-MS-TQ)*

El análisis de cuantificación se llevó a cabo usando un sistema cromatográfico Acquity™ UPLC acoplado a una fuente electrospray (ESI) y un detector Xevo Triple Cuadrupolo, suministrado por Waters (Manchester, UK).

Una columna C18 para UPLC de un tamaño de partícula de 1.7µm (2.1 x 100 mm) fue usada con un flujo medio de 0.3 mL/min y una temperatura de columna de 35°C.

Como fase móvil A se utilizó agua y como fase móvil B metanol, ambas fases con un 0.1% en volumen de ácido fórmico. El gradiente de concentración fue de 95% de fase móvil A hasta 100% de fase móvil B tras 5 minutos. El volumen de muestra inyectada fue de 5 µL.

La fuente de electrospray (ESI) se utilizó en modo de ionización positiva con un voltaje capilar de 3 kV y el voltaje de cono de muestreo se optimizó para cada compuesto individual. La optimización de los voltajes de cono y las energías de colisión de la 1,6-hexanodiamina y la isofofondiamina se realizó mediante infusión directa al espectrómetro de masas. Se utilizó argón como gas de colisión.

Las temperaturas utilizadas fueron de 120°C y 450 °C para la fuente de gas y el gas de desolvatación, respectivamente, y el flujo del gas de desolvatación fue de 600 L/h. Se utilizó el modo de monitorización de reacciones múltiples (MRM) para monitorizar los iones precursores de los analitos principales. La optimización de los voltajes de cono y las energías de colisión de la 1,6-hexanodiamina y la isofofondiamina se realizó mediante infusión directa al espectrómetro de masas. Se utilizó argón como gas de colisión.

La tabla 2 muestra el cono de voltaje, las transiciones de masa estudiadas y la energía de colisión utilizada para el análisis. Para la adquisición y procesamiento de datos se utilizó el software MassLynx v.4.1.

4. DATOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1. Optimización de las condiciones

4.1.1. Optimización del voltaje

Toda la optimización de los parámetros del espectrómetro de masas se llevó a cabo por infusión directa de cada amina por separado directamente al espectrómetro de masas. Se optimizó el voltaje de capilar (tabla 2).

Tabla 2. Abundancia en función del voltaje capilar.

Voltaje(V)	Abundancia
2	$1,27 \cdot 10^9$
2,5	$1,27 \cdot 10^9$
3	$1,27 \cdot 10^9$
3,5	$1,27 \cdot 10^9$

El voltaje de cono es un parámetro que afecta a la ionización de los analitos y es un parámetro que se optimiza para cada compuesto analizado. Para su optimización se llevó a cabo la infusión directa de una disolución de cada amina por separado (tabla 3).

Por otro lado, después de optimizar el voltaje de cono y de capilar se optimizó el voltaje de colisión ya que el objetivo es trabajar en modo MRM para tener una gran selectividad (tabla 3 y 4).

Tabla 3. Voltaje de cono y voltaje de colisión, en voltios ambos, para cada una de las aminas a analizar en sus condiciones óptimas.

	Voltaje de cono (V)	Energía de colisión (V)
HDA	40	10
IPDA	40	15

Tabla 4. Masas moleculares de IPDA y HDA en g/mol y tras la fragmentación que se produce en el espectrómetro de masas.

	M_{mol}	$M_{\text{mol}}(\text{fragmentación})$
IPDA	170	154
HDA	116	100

4.1.2. Optimización de la técnica de detección

A la hora de identificar los compuestos existen dos modos para hacerlo, MRM y SIR (selected ion recording). El modo MRM fragmenta las moléculas en trozos y las filtra, el modo SIR a través de los cuadrupolos consigue filtrar las masas que se le especifican¹².

Para ver cuál de los dos métodos de detección era más sensible, se prepararon disoluciones de bajas concentraciones para comprobar la sensibilidad de ambos métodos, calcular el ruido y los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ).

Tabla 5. Pesos y concentraciones de las disoluciones para el cálculo de la sensibilidad, el ruido y LOD y LOQ a partir de las disoluciones de 50 ng/g de la tabla 13 en ácido acético al 3%.

	m (g)	[HDA] (ng/g)	[IPDA] (ng/g)	m _T (g)
5ng/g	0,148	5,167	5,089	1,443
2ng/g	0,053	1,889	1,860	1,418
1ng/g	0,029	1,051	1,036	1,410

Tabla 6. Pesos y concentraciones de las disoluciones para el cálculo de la sensibilidad, el ruido y LOD y LOQ a partir de las disoluciones de 50 ng/g de la tabla X en etanol al 20%.

	m (g)	[HDA](ng/g)	[IPDA] (ng/g)	m _T (g)
5ng/g	0,158	6,381	6,242	1,404
2ng/g	0,056	2,263	2,214	1,404
1ng/g	0,026	1,039	1,016	1,426

$$LOD = \frac{C}{SN} \cdot 3 \text{ (Ecuación 1)}$$

$$LOQ = \frac{C}{SN} \cdot 10 \text{ (Ecuación 2)}$$

C: concentración mínima con la que se obtiene una señal medible

SN: señal del ruido

Tabla 7. Cálculo de LOQ y LOD a partir de la ecuación 1 y 2, utilizando los datos de concentraciones y S/N para el método de detección MRM.

MRM					
		C (ng/g)	S/N	LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)
ETOH	HDA	1,051	92,63	0,034	0,108
	IPDA	1,016	74,80	0,040	0,136
HAC	HDA	1,039	159,57	0,019	0,065
	IPDA	1,036	307,15	0,010	0,034

Tabla 8. Cálculo de LOQ y LOD a partir de la ecuación 1 y 2, utilizando los datos de concentraciones y S/N para el método de detección SIR.

SIR					
		C (ng/g)	S/N	LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)
ETOH	HDA	6,381	18,43	0,814	2,713
	IPDA	6,242	263,29	0,057	0,190
HAC	HDA	1,889	33,43	0,180	0,598
	IPDA	1,860	85,57	0,070	0,234

Comparando los valores de LOQ y LOD de ambos métodos para cada una de las aminas, se observa como el método MRM es más sensible que el SIR además de proporcionar una mayor selectividad.

4.2. Recta de calibrado

Se prepararon dos disoluciones de 10 mg/Kg de ambas aminas en etanol y en ácido acético, a partir de las cuales se hicieron diluciones para preparar las disoluciones de la recta de calibrado. Las diluciones se muestran en las tablas a continuación y las rectas de calibrado en los gráficos a continuación.

Tabla 9. Pesos para la disolución de HDA de 10mg/Kg en etanol y en ácido acético.

Disolución de HDA 10 mg/Kg			
Disolvente	m(g)	m _T (g)	[HDA](mg/Kg)
Etanol	0,014	10,046	11,273
Ácido acético	0,012	10.001	9,999

Tabla 10. Pesos para la disolución de IPDA de 10mg/Kg en etanol y en ácido acético.

Disolución de IPDA 10 mg/Kg			
Disolvente	m(g)	m _T (g)	[IPDA](mg/Kg)
Etanol	0,084	10,025	11,505
Ácido acético	0,073	10.011	9,999

Tabla 11. Pesos y concentración para IPDA y HDA en etanol al 20% a partir de las disoluciones de las tablas 9 y 10.

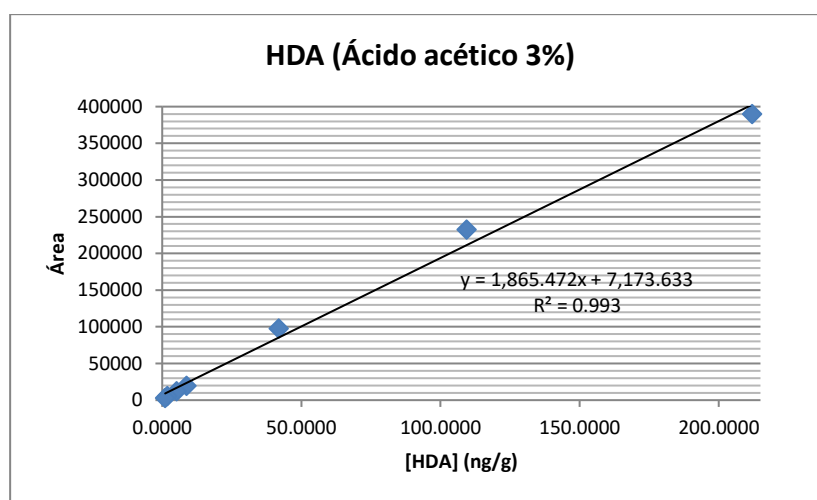
	m(g)	Concentración (ng/g)	m _T (g)
IPDA	0,505	580,876	10,012
HDA	0,502	566,275	10,030

Tabla 12. Pesos y concentración para IPDA y HDA en ácido acético al 3% a partir de las disoluciones de las tablas 9 y 10.

	m(g)	Concentración (ng/g)	m _T (g)
IPDA	0,506	505,660	10.041
HDA	0,519	519,337	10.090

Tabla 13. Pesos y concentraciones para IPDA y HDA en ácido acético al 3%. Las disoluciones de 1000 y 750 ng/g se preparan a partir de las disoluciones de las tablas 9 y 10; las disoluciones de 200, 100, 50 y 10 ng/g se preparan a partir de la disolución de 500 ng/g de la tabla 12.

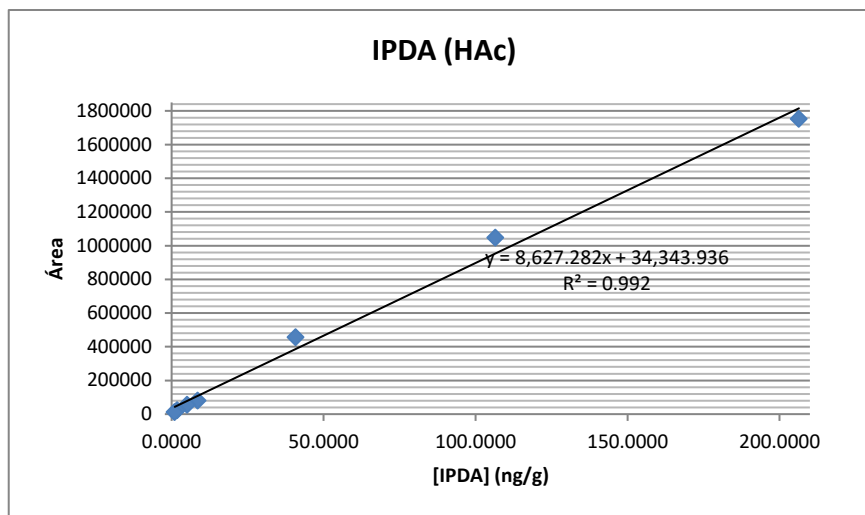
Ácido acético 3%				
Disolución (ng/g)	m _{HDA} (g)	m _{IPDA} (g)	[HDA] (ng/g)	[IPDA] (ng/g)
1000	0,140	0,1412	996,309	1008,491
750	0,105	0,1164	863,128	957,791
500			519,337	505,659
200	0,578		211,976	206,393
100	0,295		109,395	106,514
50	0,116		41,898	40,795
10	0,028		8,792	8,560



Gráfica 1. Recta de calibrado para el HDA en ácido acético al 3%.

Tabla 14. Cálculo de las concentraciones de HDA en ng/gen ácido acético al 3% obtenidas a partir de las áreas de los cromatogramas integrados.

[HDA] (ng/g)	Área
211,976	389606
109,395	232524
41,899	97410
8,792	19473
5,167	12037
1,889	5270
1,051	3087



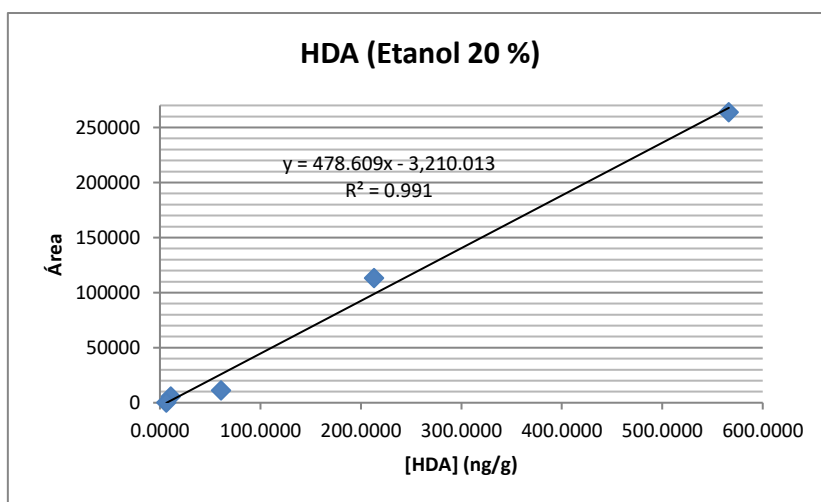
Gráfica 2. Recta de calibrado para el IPDA en ácido acético al 3%.

Tabla 15. Cálculo de las concentraciones de IPDA en ng/g en ácido acético al 3% obtenidas a partir de las áreas de los cromatogramas integrados.

[IPDA] (ng/g)	Área
206,393	1753616
106,513	1049102
40,795	456751
8,560	81072
5,089	56518
1,860	24907
1,036	12660

Tabla 16. Pesos y concentraciones para IPDA y HDA en etanol al 20%. Las disoluciones de 1000 y 750 se preparan a partir de las disoluciones de las tablas 9 y 10; las disoluciones de 200, 100, 50 y 10 ng/g se preparan a partir de la disolución de 500 ng/g de la tabla 11.

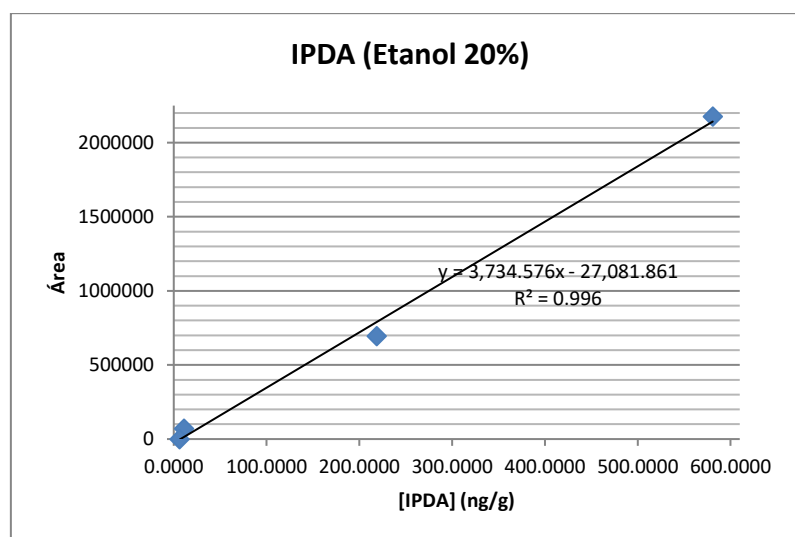
Disolución (ng/g)	m _{HDA} (g)	m _{IPDA} (g)	[HDA] (ng/g)	[IPDA] (ng/g)
1000	0,150	0,146	1209,500	1211,674
750	0,103	0,126	832,639	1038,717
500			566,275	580,876
200	0,552		213,101	218,596
100	0,281		113,600	116,632
50	0,146		58,761	60,276
10	0,027		10,759	11,037



Gráfica 3. Recta de calibrado para HDA en etanol al 20%.

Tabla 17. Cálculo de las concentraciones de HDA en ng/g en etanol al 20% obtenidas a partir de las áreas de los cromatogramas integrados.

[HDA] (ng/g)	Área
566,275	263851
213,101	113329
60,920	11202
10,759	5637
6,381	308



Gráfica 4. Recta de calibrado para IPDA en etanol al 20%.

Tabla 18. Cálculo de las concentraciones de IPDA en ng/g en etanol al 20% obtenidas a partir de las áreas de los cromatogramas integrados.

[IPDA] (ng/g)	Área
580,876	2176610
218,596	695030
11,037	69958
6,242	293

4.2.1. Cálculo de migraciones en simulantes a partir de la recta de calibrado

Tabla 19. Masas de adhesivo añadido, en gramos, a cada uno de los corchos indicados en la tabla como muestras.

Muestra	m _{adhesivo} (g)
1	0,556
2	0,587
3	0,562

Tabla 20. Área y concentraciones conseguidas a partir de los cromatogramas obtenidos de las disoluciones de las muestras 1, 2 y 3.

Disoluciones en ácido acético 3%			
IPDA		HDA	
Área	[IPDA] (ng/g)	Área	[HDA] (ng/g)
1151826	137,495	100573	57,773
1450247	172,087	87229	50,618
1087436	130,031	69695	41,216

Tabla 21. Área y concentraciones conseguidas a partir de los cromatogramas obtenidos de las disoluciones de las muestras 1, 2 y 3.

Disoluciones en etanol al 20%			
IPDA		HDA	
Área	[IPDA] (ng/g)	Área	[HDA] (ng/g)
61043	120,838	146020	58,982
74028	147,969	212041	79,129
64736	128,554	123994	52,261

Con las rectas de calibrado que se obtuvieron en las gráficas 3 y 4, se pueden obtener las concentraciones de IPDA y HDA.

Tabla 22. Cálculo del promedio de las concentraciones para IPDA y HDA utilizando las rectas obtenidas en las gráficas 1, 2, 3 y 4.

Concentraciones a partir de las rectas de calibrado		
	Etanol	Ácido acético
IPDA	132,453	146,538
HDA	63,457	49,869

Para calcular el intervalo de confianza utilizamos la ecuación 3.

$$IC = \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \quad \text{Ecuación 3.}$$

IC: intervalo de confianza

σ : desviación estándar

n: número de muestras

Tabla 23. Cálculo de los intervalos de confianza, en ng/g, a al 95% para ambos compuestos utilizando las desviaciones estándar obtenidas a partir de la media de las concentraciones con las rectas del ácido acético al 3% y del etanol al 20%.

Intervalo de confianza (ng/g)		
	Etanol	Ácido acético
IPDA	±8,071	±12,955
HDA	±8,073	±4,794

Para poder calcular la concentración que hay en las muestras, C_0 , hay que tener en cuenta la dilución que se hizo, que fue de 1:10.

$$C_0 = \frac{m \cdot C}{\alpha} \cdot \frac{1 \mu g/L}{1 ppb} \cdot \frac{1 mg}{1000 \mu g} \quad \text{Ecuación 4.}$$

m: masa total del vial para medir en gramos

C: concentración obtenida a partir de la recta de calibrado en ng/g

α : masa tomada de la muestra

Cambiando las unidades del intervalo de confianza también, obtenemos nuestro resultado en mg/l y tomando la densidad del cava como aproximadamente 1 kg/l el resultado se puede dar en mg/kg para poder compararlo con los valores que aparecen en el Reglamento.

Tabla 24. Cálculo de las concentraciones en las muestras en las cuales se sumergieron los corchos, expresadas en mg/Kg de simulante.

	Concentración de la muestra	
	Etanol	Ácido acético
IPDA	1,325 \pm 0,081	1,4654 \pm 0,130
HDA	0,635 \pm 0,081	0,4987 \pm 0,048

Comparando los valores obtenidos con los de la columna 8 de la tabla 1, se puede comprobar que ninguno de los dos compuestos migra por encima de sus límites.

4.3. Preparación disoluciones de adición estándar para el análisis de las migraciones a cava

Para la preparación de la recta de adición estándar se prepararon las disoluciones que se muestran a continuación.

Tabla 25. Concentraciones iniciales para IPDA y HDA en mg/Kg.

	C ₀ (mg/Kg)
HDA	8089,64
IPDA	1374,65

Tabla 26. Preparación de las disoluciones de 10 mg/Kg a partir de las disoluciones de la tabla 24, siendo *m* la masa cogida de cada una de las aminas en gramos, *m*_{H₂O} la masa de agua añadida para realizar la dilución en gramos y *C* la concentración obtenida para cada amina en mg/Kg

Disoluciones de 10mg/Kg			
	<i>m</i> (g)	<i>m</i> _{H₂O} (g)	<i>C</i> (mg/Kg)
HDA	0,018	14,997	9,520
IPDA	0,111		10,097

Tabla 27. Preparación de las disoluciones de 500 ng/g a partir de la disolución de la tabla 25, siendo *m* la masa tomada de la disolución de 10 mg/Kg en gramos, *m*_{H₂O} la masa de agua añadida para realizar la dilución y *C* la concentración final de cada amina en ng/g.

Disolución de 500ng/g			
	<i>m</i> (g)	<i>m</i> _{H₂O} (g)	<i>C</i> (ng/g)
HDA	0,760	14,791	465,424
IPDA			493,635

Tabla 28. Preparación de la disolución de 50 ng/g a partir de la disolución de la tabla 26, diluyendo con la muestra. Siendo m la masa de la disolución de la tabla 26 en gramos, m_m la masa de la muestra utilizada para diluir en gramos, y C la concentración conocida obtenida en ng/g.

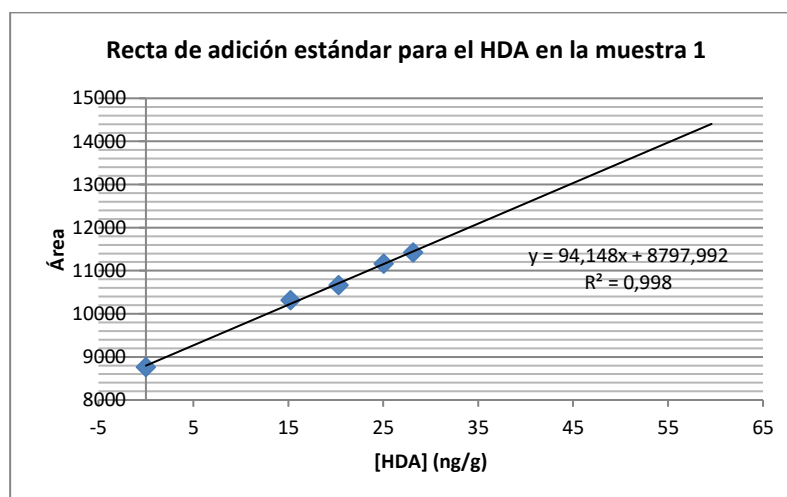
50 ng/g muestra 1		
m (g)	m_m	C (ng/g)
0,9903	10,052	50,813

4.3.1. Cálculo de migraciones a partir de la recta de adición estándar en cava

Para la preparación de las disoluciones de la recta de adición estándar, se utilizaron las disoluciones de la tabla 26 y 27 y se diluyeron con la muestra de cava después de someterlo a migración del corcho diluido 1:25. En las siguientes tablas se muestran las disoluciones y las rectas de calibrado obtenidas.

Tabla 29. Cálculo de las concentraciones para la recta de calibrado por adición estándar, siendo m_A la masa total que se introdujo en el vial de medida añadiendo la muestra en gramos para completar la disolución, m_B la masa de la disolución de 50 ng/g en gramos de la tabla 27, [HDA] la concentración de HDA en ng/g y A_{HDA} el área para el HDA obtenida en el cromatograma

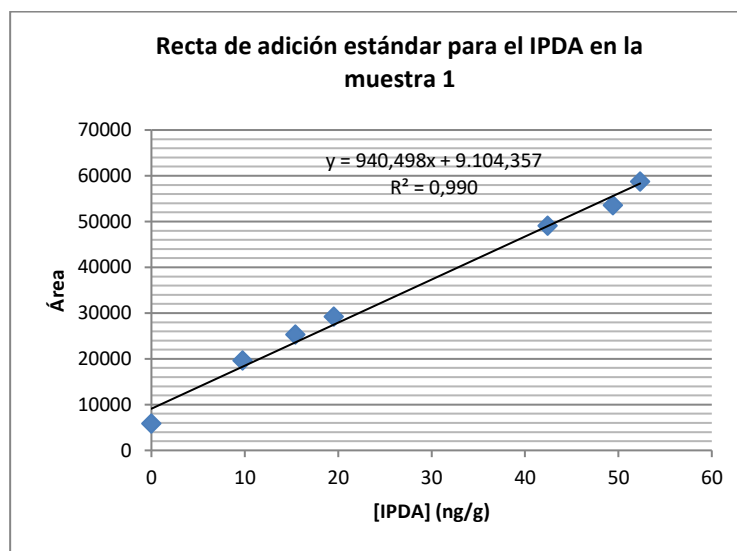
Concentraciones de HDA para la muestra 1 por adición estándar				
Concentración	m_A (g)	m_B (g)	[HDA] (ng/g)	A_{HDA}
30	1,521	0,843	28,156	11425
25	1,409	0,695	25,050	11164
20	1,395	0,558	20,319	10666
15	1,379	0,413	15,235	10318
muestra 1	1,491		0	8769



Gráfica 5. Representación de la recta por adición estándar para el HDA en la muestra 1.

Tabla 30. Cálculo de las concentraciones para la recta de calibrado por adición estándar, siendo m_A la masa total que se introdujo en el vial de medida añadiendo la muestra en gramos para completar la disolución, m_B la masa de la disolución de 50 ng/g en gramos de la tabla 27, [IPDA] la concentración de IPDA en ng/g y A_{IPDA} el área para el IPDA obtenida en el cromatograma.

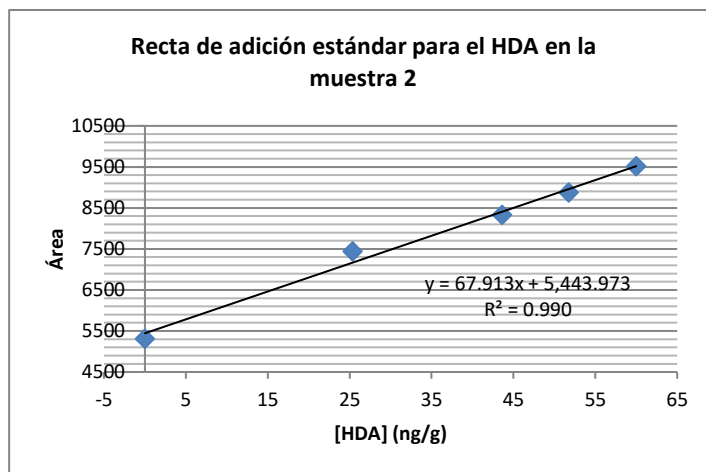
Concentraciones de IPDA para la muestra 1 por adición estándar				
Concentración	m_A	m_B	[IPDA] (ng/g)	A_{IPDA}
60	1,394	0,165	52,333	58766
50	9,010	1,003	49,429	53582
40	1,284	0,121	42,416	49071
20	0,871	0,569	19,533	29210
15	0,964	0,437	15,415	25293
10	1,126	0,277	9,754	19620
muestra 1	1,491		0	5830



Gráfica 6. Representación de la recta por adición estándar para el IPDA en la muestra 1.

Tabla 31. Cálculo de las concentraciones para la recta de calibrado por adición estándar, siendo m_A la masa total que se introdujo en el vial de medida añadiendo la muestra 2 en gramos para completar la disolución, m_B la masa de la disolución de 50 ng/g en gramos de la tabla 27, [HDA] la concentración de HDA en ng/g y A_{HDA} el área para el HDA obtenida en el cromatograma.

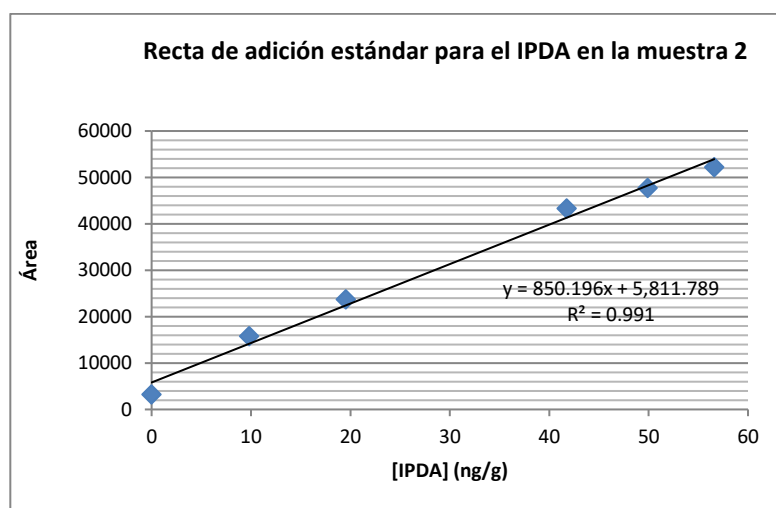
Concentraciones de HDA para la muestra 2 por adición estándar				
Concentración	m_A (g)	m_B (g)	[HDA] (ng/g)	A_{HDA}
60	1,333	0,155	59,986	9519
50	10,017	1,005	51,733	8879
40	1,443	0,122	43,608	8337
25	1,455	0,713	25,363	7441
muestra 2	1,438		0	5315



Gráfica 7. Representación de la recta por adición estándar para el HDA en la muestra 2.

Tabla 32. Cálculo de las concentraciones para la recta de calibrado por adición estándar, siendo m_A la masa total que se introdujo en el vial de medida añadiendo la muestra 2 en gramos para completar la disolución, m_B la masa de la disolución de 50 ng/g en gramos de la tabla 27, [IPDA] la concentración de IPDA en ng/g y A_{IPDA} el área para el IPDA obtenida en el cromatograma.

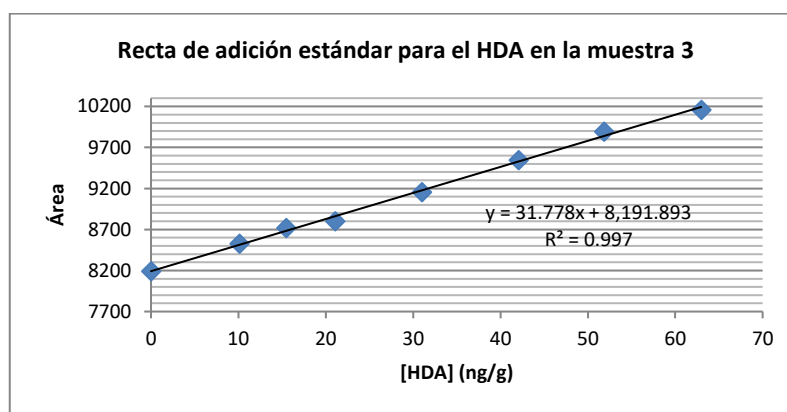
Concentraciones de IPDA para la muestra 2 por adición estándar				
Concentración	m_A	m_B	[IPDA] (ng/g)	A_{IPDA}
60	1,248	0,162	56,600	52221
50	4,494	0,505	49,904	47698
40	1,288	0,119	41,741	43287
20	0,870	0,559	19,518	23703
10	1,172	0,287	9,809	15746
muestra 2	1,438		0	3186



Gráfica 8. Representación de la recta por adición estándar para el IPDA en la muestra 2.

Tabla 33. Cálculo de las concentraciones para la recta de calibrado por adición estándar, siendo m_A la masa total que se introdujo en el vial de medida añadiendo la muestra 3 en gramos para completar la disolución, m_B la masa de la disolución de 50 ng/g en gramos de la tabla 27, [HDA] la concentración de HDA en ng/g y A_{HDA} el área para el HDA obtenida en el cromatograma.

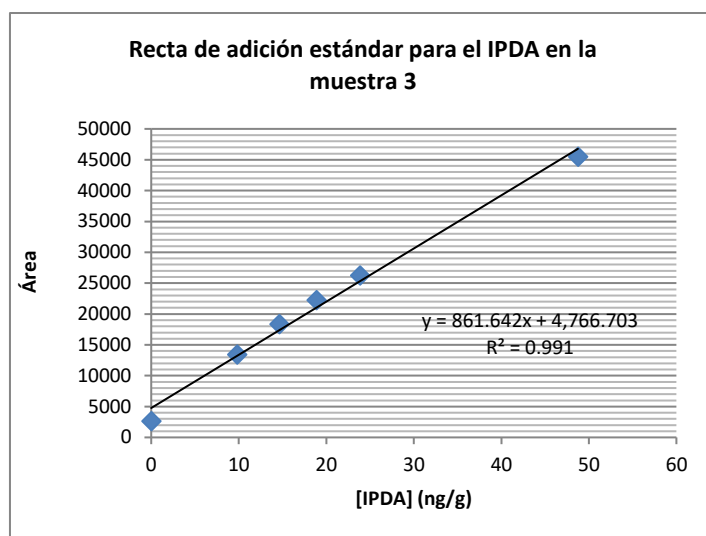
Concentraciones de HDA para la muestra 3 por adición estándar				
Concentración	$m_A(g)$	$m_B(g)$	[HDA] (ng/g)	A_{HDA}
60	1,455	0,178	62,973	10160
50	10,015	1,007	51,858	9892
40	1,402	0,114	42,073	9544
30	1,409	0,842	30,993	9157
20	1,391	0,565	21,080	8799
15	1,422	0,424	15,471	8717
10	1,443	0,281	10,111	8529
muestra 3	1,455	0,178	62,973	8191



Gráfica 9. Representación de la recta por adición estándar para el IPDA en la muestra 3.

Tabla 34. Cálculo de las concentraciones para la recta de calibrado por adición estándar, siendo m_A la masa total que se introdujo en el vial de medida añadiendola muestra 2 en gramos para completar la disolución, m_B la masa de la disolución de 50 ng/g en gramos de la tabla 27, [IPDA] la concentración de IPDA en ng/g y A_{IPDA} el área para el IPDA obtenida en el cromatograma.

Concentraciones de IPDA para la muestra 3 por adición estándar				
Concentración	$m_A(g)$	$m_B(g)$	[IPDA] (ng/g)	A_{IPDA}
50	1,407	0,168	58,762	45487
25	5,019	0,496	48,748	26267
20	1,456	0,123	41,716	22253
15	1,474	0,842	27,845	18354
10	1,437	0,703	23,846	13444
muestra 3	1,445	0,559	18,864	2662



Gráfica 10. Representación de la recta por adición estándar para el IPDA en la muestra 3.

Utilizando las rectas obtenidas, tomando $y=0$ y despejando x que sería la concentración en ng/g, además de tener en cuenta la dilución generada, se puede calcular la concentración de cada una de las aminas que hay en las muestras. Finalmente se divide entre 1000 para convertir las unidades en mg/l (mg/Kg mejor porque se compara con valores de la legislación que están en mg/kg).

Tabla 35. Cálculo de la concentración de IPDA y HDA en cada una de las muestras en mg/kg, así como la media de las concentraciones, su desviación estándar y el intervalo de confianza al 95%.

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Media	DSR	Intervalo de confianza
HDA	2,300	2,251	6,792	3,781	2,608	1,506
IPDA	0,248	0,177	0,146	0,190	0,052	0,030

Si se comparan los valores obtenidos en la tabla 34 con los de la columna 8 de la tabla 1, se puede ver como para el IPDA no se superan los límites establecidos, pero para el HDA, en una de las muestras y finalmente en la media se superan los límites establecidos por el Reglamento. Como este valor podría considerarse anómalo, se realizó el test Q de Dixon para comprobar si podía eliminarse.

$$Q_{\text{exp}} = \frac{X_a - X_1}{X_a - X_o} \quad \text{Ecuación 5.}$$

X_a : valor sospechosos

X_1 : valor más cercano al valor sospechoso

X_o : valor más bajo

Si $Q_{exp} > Q_{crit}$, el valor considerado como sospechoso puede eliminarse. Se obtiene un valor de Q_{exp} de 0,9890 que es mayor que el valor tabulado de Q_{crit} , para un intervalo de confianza del 95%, que es de 0,941, por lo que la concentración de la muestra 3 para el HDA puede eliminarse.

Tabla 36. Concentraciones expresadas como mg/kg corregidas para el HDA en cada una de las muestras, así como la media de las concentraciones, su desviación estándar y el intervalo de confianza al 95%.

	Muestra 1	Muestra 2	Media	DSR	IC
HDA	2,300	2,251	2,276	0,035	0,025

Tabla 37. Comparación de la concentración obtenida en la muestra, $C_{muestra}$, y la concentración máxima que podría obtenerse sumándole el intervalo de confianza, C_{max} , con la concentración que indica la regulación, $C_{regulacion}$, todas ellas en mg/kg.

	$C_{muestra}$	C_{max}	$C_{regulacion}$
HDA	2,276	2,311	2,4
IPDA	0,19	0,22	6

5. CONCLUSIONES

Se ha estudiado la migración de dos aminos formadas por reacción de diisocianatos pertenecientes a un adhesivo utilizado para contacto alimentario, utilizando la técnica de UPLC-MS, la cual proporciona una buena selectividad y sensibilidad, necesarias en este tipo de análisis. Los valores de migración obtenidos de las aminos en las muestras analizadas fueron muy bajos, por eso la sensibilidad de la técnica UPLC-MS la hace ideal para este tipo de análisis.

La optimización del método analítico se puede realizar de una manera más eficiente, si los NIAS son conocidos, es por ello que se obtuvieron unos resultados con muy buena linealidad y reproducibilidad.

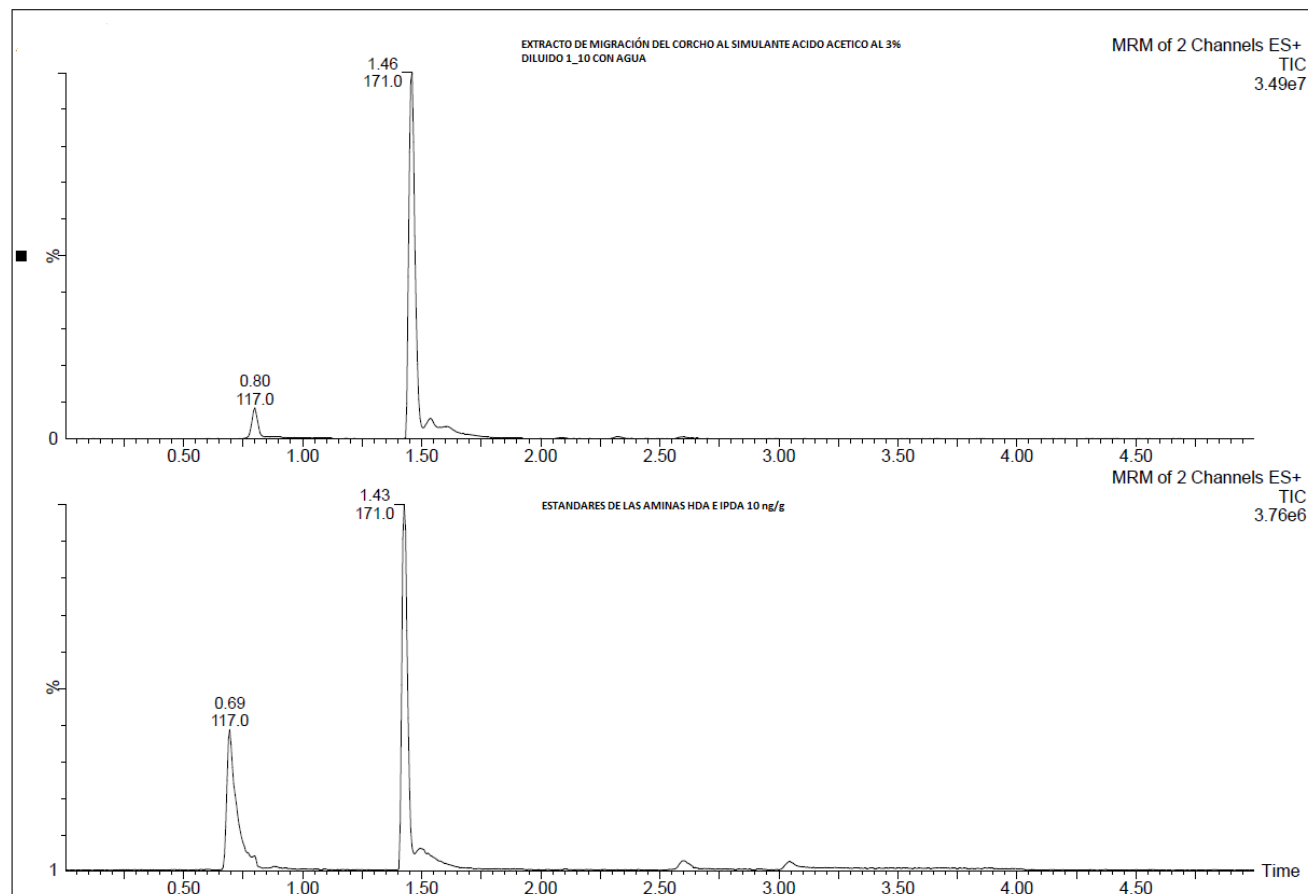
El método de análisis desarrollado en modo MRM para conseguir una alta selectividad necesaria para trabajar con muestras alimentarias en este trabajo ha permitido obtener una buena sensibilidad, consiguiendo límites de detección del orden de partes por trillón.

Tras obtener los valores de cuantificación para cada una de las aminos, se comprobó que no superaban los límites establecidos por la legislación vigente.

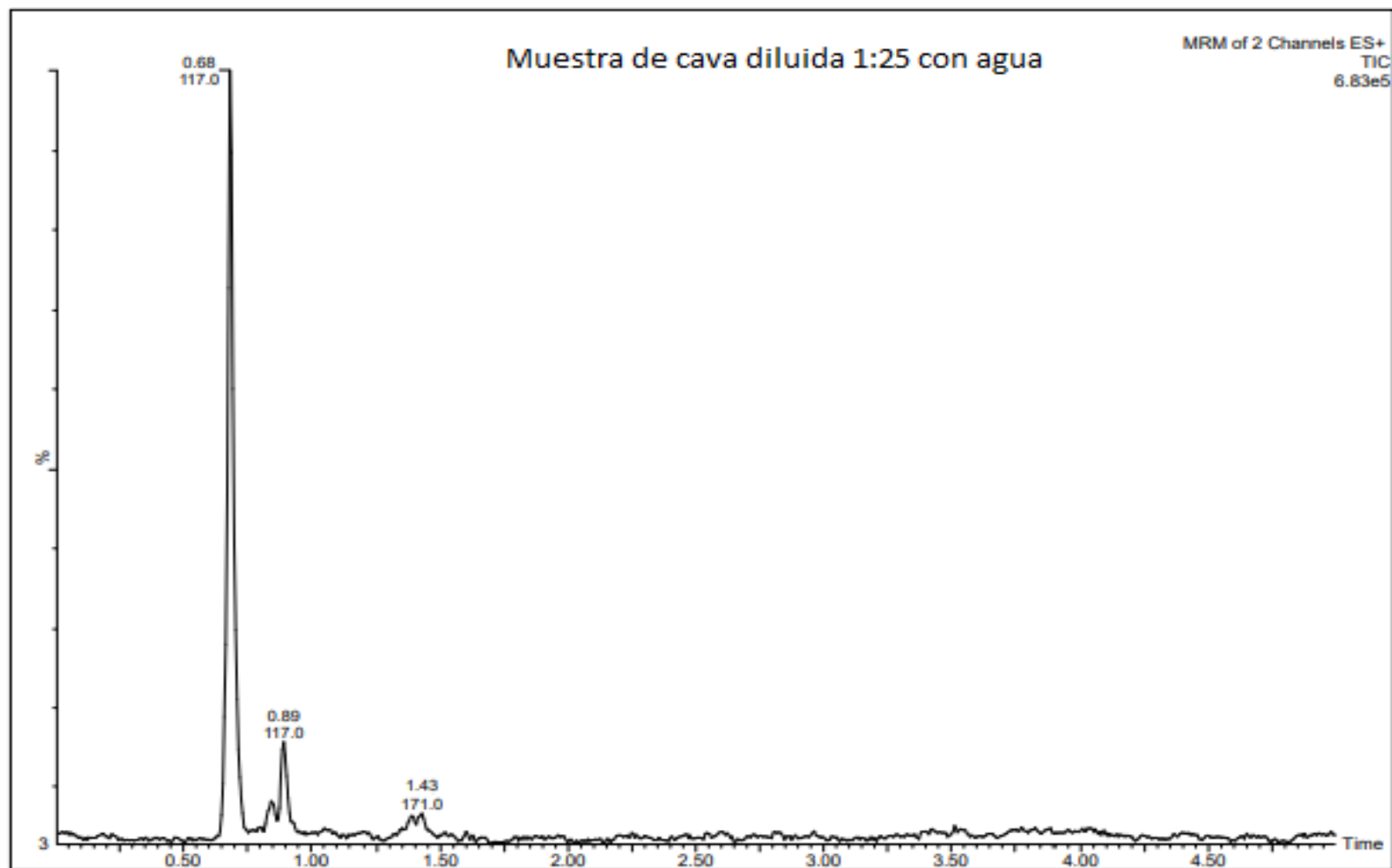
6. BIBLIOGRAFÍA

1. Elena Canellas Aguarales *TESIS DOCTORAL* 2010. Published online 2010.
2. Canellas E, Vera P, Song XC, Nerin C, Goshawk J, Dreolin N. The use of ion mobility time-of-flight mass spectrometry to assess the migration of polyamide 6 and polyamide 66 oligomers from kitchenware utensils to food. *Food Chem.* 2021;350(September 2020):129260. doi:10.1016/j.foodchem.2021.129260
3. Ubada S, Aznar M, Rosenmai AK, Vinggaard AM, Nerín C. Migration studies and toxicity evaluation of cyclic polyesters oligomers from food packaging adhesives. *Food Chem.* 2020;311(October 2019):125918. doi:10.1016/j.foodchem.2019.125918
4. E. Navascués FC y JAS. *ACE Revista de Enología*. El Metab microbiano en el binomio corcho-vino.
5. European Chemicals Agency. Accessed August 31, 2021. <https://echa.europa.eu/es/substance-information/-/substanceinfo/100.018.788>
6. European Chemicals Agency. Accessed August 31, 2021. <https://echa.europa.eu/es/substance-information/-/substanceinfo/100.011.350>
7. Eur-Lex Derecho de la Unión Europea. Accessed August 31, 2021. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=CELEX%3A32004R1935&qid=1630421238361>
8. Eur-Lex Derecho de la Unión Europea. Accessed August 31, 2021. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=CELEX%3A32011R0010&qid=1630421333593>
9. Canellas E, Vera P, Nerín C, Dreolin N, Goshawk J. Ion mobility quadrupole time-of-flight high resolution mass spectrometry coupled to ultra-high pressure liquid chromatography for identification of non-intentionally added substances migrating from food cans. *J Chromatogr A.* 2020;1616:460778. doi:10.1016/j.chroma.2019.460778
10. Toribio F. *Cromatografía de líquidos - espectrometría de masas*. Desarro Metodol analítica basada en el uso técnicas Comb para la Determ Amin heterocíclicas. Published online 2003;167-169. <http://diposit.ub.edu/dspace/handle/2445/42822>
11. Vera P, Canellas E, Barknowitz G, Goshawk J, Nerín C. Ion-Mobility Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry: A Novel Technique Applied to Migration of Nonintentionally Added Substances from Polyethylene Films Intended for Use as Food Packaging. *Anal Chem.* 2019;91(20):12741-12751. doi:10.1021/acs.analchem.9b02238
12. Gutiérrez MC, Droguet M. La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: Identificación de compuestos causantes de mal olor. *Bol Intexter del Inst Investig Text y Coop Ind.* 2002;(122):35-41.

7. ANEXOS



Anexo 1. Cromatogramas obtenidos por la técnica UPLC-MS-TQ del extracto de migración del corcho al simulante ácido acético 3% diluido 1:10 con agua (arriba) y estándares de las aminas a concentración de 10 ng/g en ácido acético 3%.



Anexo 2. Cromatograma obtenidos por la técnica UPLC-MS-TQ del extracto de migración del corcho al cava diluido 1:25 con agua.